

細胞株開発のためのハイス
ループットなナノウェルベー
スの画像検証クローニング

CellCelector Flex

Simplifying Progress

SARTORIUS

ハイスループットなナノウェルベースの画像検証クローニング

ハイスループットなナノウェルベースの画像検証クローニング技術 (HT-NIC) は、医薬品生産細胞株クローンの迅速な作製を可能にする新しい手法です。クローンは、堅牢なインプロセスの画像検証でモノクローナリティを担保しながら、1回のクローン作成ラウンドで作製されます。

この統合されたモノクローナリティとクローンの生存率評価、および96または384ウェルプレートへのクローン移植後の業界をリードする増殖率を実現したことにより、CellCelectorシングルセルクローニングテクノロジーは次世代のシングルセルクローニングアプローチを代表するものとなっています。従来の方法をはるかに超え、限界希釈法 (LD)、蛍光活性化セルソーティング (FACS)、シングルセルプリンティング技術に代わる優れた方法を提供します。この特許出願中の方法は、ProBioGen AG および他の CellCelector Flex のお客様と共同で開発・検証されています。

CellCelector Flexの仕様

ハイスループット

- 数千のクローンを並行して解析

生産性評価

- 高生産性クローンを標的とした選択

細胞の生存率

- 極めて増殖困難な細胞株でも、シングルセルからの業界をリードする増殖率を実現

コスト削減

- 時間、消耗品、培地、およびストレージ容量を大幅に削減

増殖評価

- 増殖の速いクローンの選択的な単離

モノクローナリティ

- 統合されたモノクローナリティの証明を備えた1ラウンドでのシングルセルクローニングワークフロー



ピッキングモジュール

- シングルセルピッキングモジュール
- 接着コロニーピッキングモジュール
- 半固形培地ピッキングモジュール

デスティネーションプレートおよびバッファー用デッキトレイ

デスティネーションプレートの温度調節 (4 °C ~ 40 °C)

ソースプレート用オートフォーカス付きモーター駆動式高精度XYステージ

CCDカメラ付き倒立顕微鏡

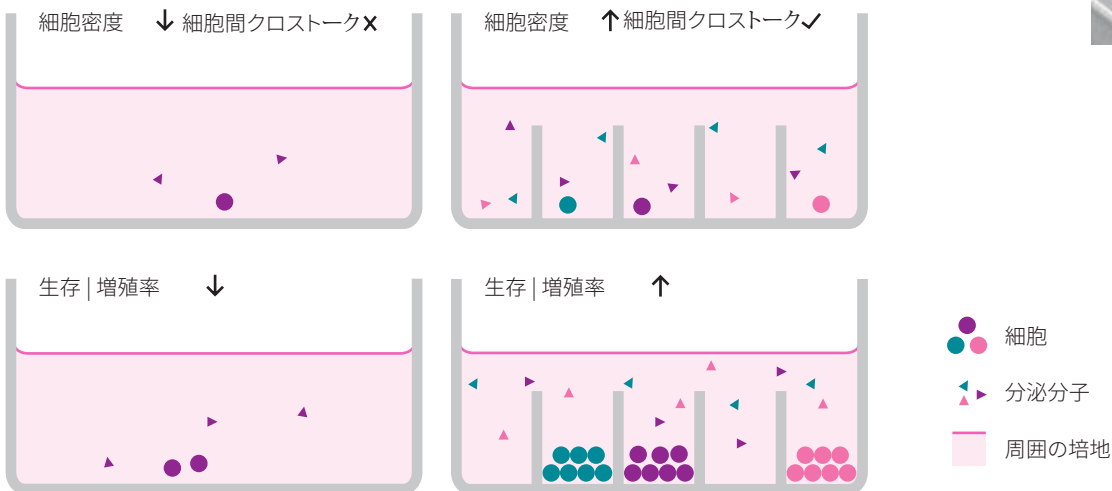
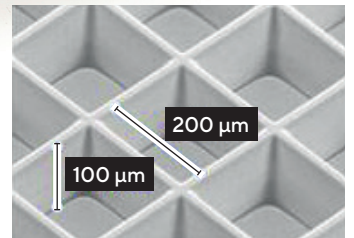
- 対物レンズ 2倍 ~ 40倍
- 明視野 (BF)
- 位相差 (PhC)
- 蛍光 (6励起チャンネル、蛍光色素を使用した最大14色)

CellSelector Flex シングルセルピッキングおよびコロニーピッキングプラットフォームを使用すれば、クローンを選択する前に効果的に評価・検証することができるようになります。1週間以内で、シングルセルプールからモノクローナルで生存力のある、生産性の高いコロニーが得られます。大量のプレートに頼って勝敗を決めるのではなく、実際のデータを使ってクローンの将来を確実に予測することができます。これにより、消耗品や培地のコスト、インキュベーターのスペース、そして何よりも貴重な時間を節約することができます。失敗や2周目のクローニングラウンド、および不必要な手順を避けることができます。

CellSelectorナノウェル細胞培養プレート

HT-NIC法は、CellSelectorナノウェルプレートをベースにしています。これらのプレートは、各ウェルの底に数千個のナノウェルを備えた、さまざまなフォーマットで提供されています。24ウェルプレートの場合、ウェルあたり4,000ナノウェル、すなわちプレートあたり100,000ナノウェルという数になります。ナノウェル内にある細胞は、互いに効率的に分離されます。

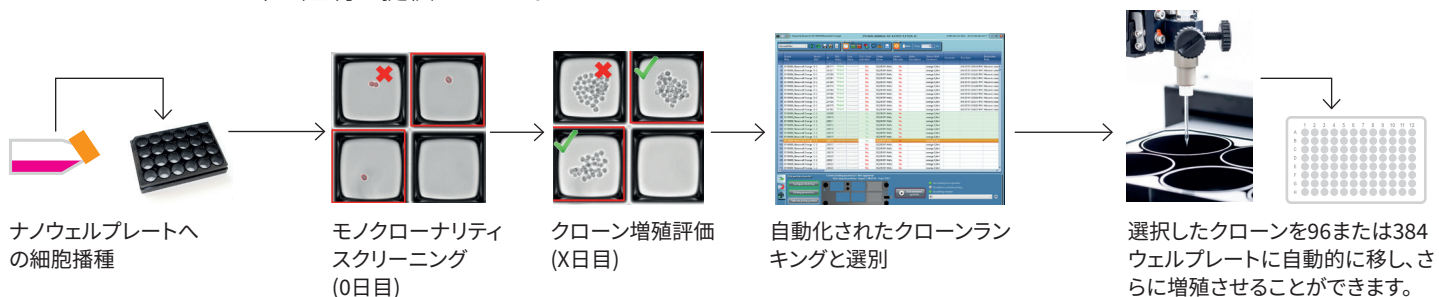
局所的な分離にもかかわらず、ナノウェル内の細胞は同じ培地で覆われているため、そこには効果的な細胞クロストークが生じ得ます。プール内のすべての細胞は、それらのモノクローナリティを維持しながら、細胞株の増殖に貢献することになります。これにより、培養が非常に困難な細胞株においても、業界をリードするシングルセルからの増殖率を実現しています。



CellCelectorナノウェルを用いたシングルセルクローニングワークフロー

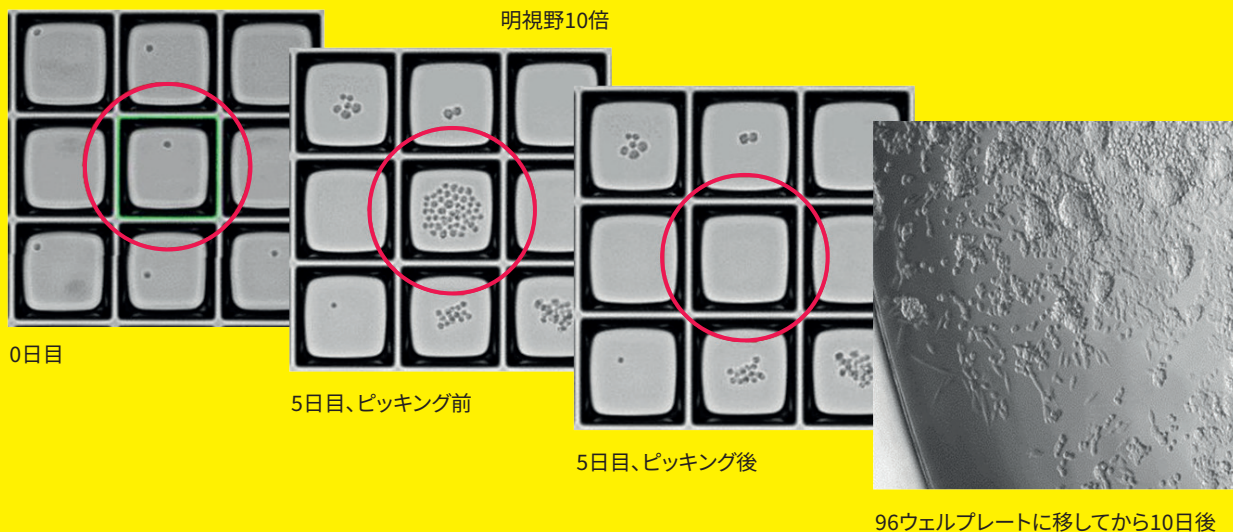
細胞播種は、従来の細胞培養プレートと同様に行われます。播種後、細胞は古典的なポアソン分布に従って、ナノウェル内にランダムに捕捉されます。ウェルの自動スキャンと、それに続くシングルセルを含むすべてのナノウェルの自動識別により、堅牢でドキュメント化された画像ベースのモノクローナリティの証明が提供されます。

播種した細胞数にもよりますが、1ウェルあたり400~600個のシングルセルが捕捉され、解析することができます。複数のウェルに播種することで、それぞれのナノウェルプレートに含まれている最大14,000個のシングルセルからスタートすることができます。



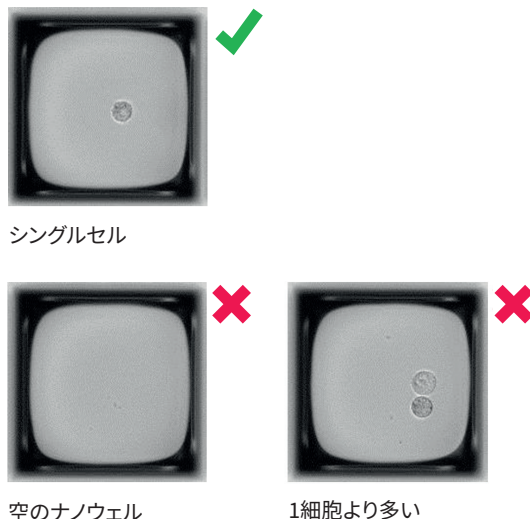
モノクローナリティが記録された後、細胞をインキュベーター内で3~6日培養すると、クローンあたり20~75個の細胞が得られます。従来のメチルセルロースを用いた方法とは異なり、CellCelectorナノウェルを用いた方法では、液体培地でのコロニー増殖が可能です。クローンは同じ培地を共有していますが、ナノウェルの壁によって互いに効果的に分離されています。

ます。細胞がシングルセルからのクローンに成長した後、ナノウェルプレートが再度スキャンされ、モノクローナルの生存クローンが自動的に選択され、さらなる分析とアップスケーリングのために96または384ウェルプレートに移されます。



自動化されたモノクローナリティの証明： ナノウェルでのシングルセルの堅牢な検出

従来のシングルセルクローニングワークフローでは、シングルセルが96ウェルプレートに播種されると、細胞はウェルの端に固着することが多いため、信頼性の高い自動シングルセル検出は困難です。したがって、0日目の特定のクローンのモノクローナリティは、通常手作業で、またはクローンが成長した時点で遡及的に確認されます。しかし、なぜ細胞が占める表面面積の100倍を超えるウェル領域内のシングルセルを探索するのでしょうか。CellSelector HT-NICのアプローチでは、細胞は200 μmの大きなナノウェルの中で分離され、はっきりと見えるため、当社のソフトウェアによって確実かつ自動的に識別できます。播種直後や、細胞がナノウェルの境界に接触している場合でも識別が可能です。



限界希釈は不要です：

CellSelector Flexは100%のモノクローナリティを提供します

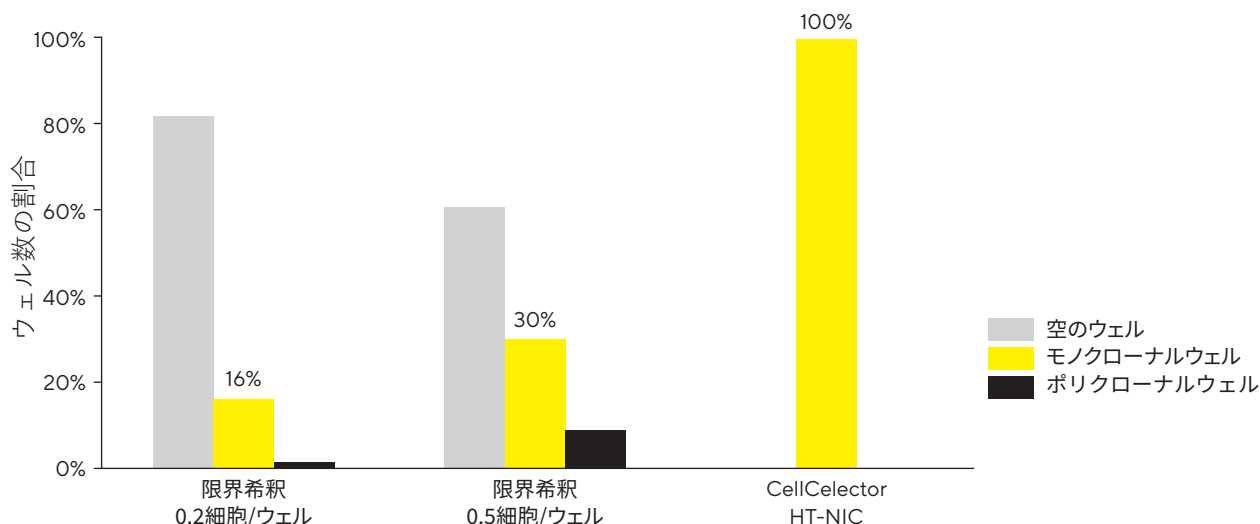
シングルセルクローニングの方法として確立されている限界希釈では、モノクローナリティは統計的性質に基づいており、ポアソン分布に従ってウェルあたりに播種された平均細胞数に依存します。ポリクローナルウェルの割合を制限するために、播種する細胞密度はウェルあたり0.2個以下とされています。さらに、モノクローナルなウェルは約16%に過ぎず、他のウェルは空のままです。したがって、400個のモノクローナルウェルでスタートするためには、25枚以上の96ウェルプレートに播種する必要があります。細胞密度を上げることでモノクローナルウェルの数を2倍にできる可能性はありますが、ポリクローナルウェルが増える高いリスクを伴います。

CellSelector HT-NICクローニング法は、シングルセルナノウェルの自動識別、クローンへの増殖の追跡、および増殖したクローンのクロスコンタミネーションなしでの96ウェル

プレートへの移植により、サンプル調製、細胞タイプ、ナノウェルプレートへの播種に使用される細胞密度にかかわらず、100%のモノクローナルウェルを提供します。

CellSelectorナノウェルベースのクローニング法と限界希釈法によるモノクローナルウェルの取得効率の比較を下図に示します。

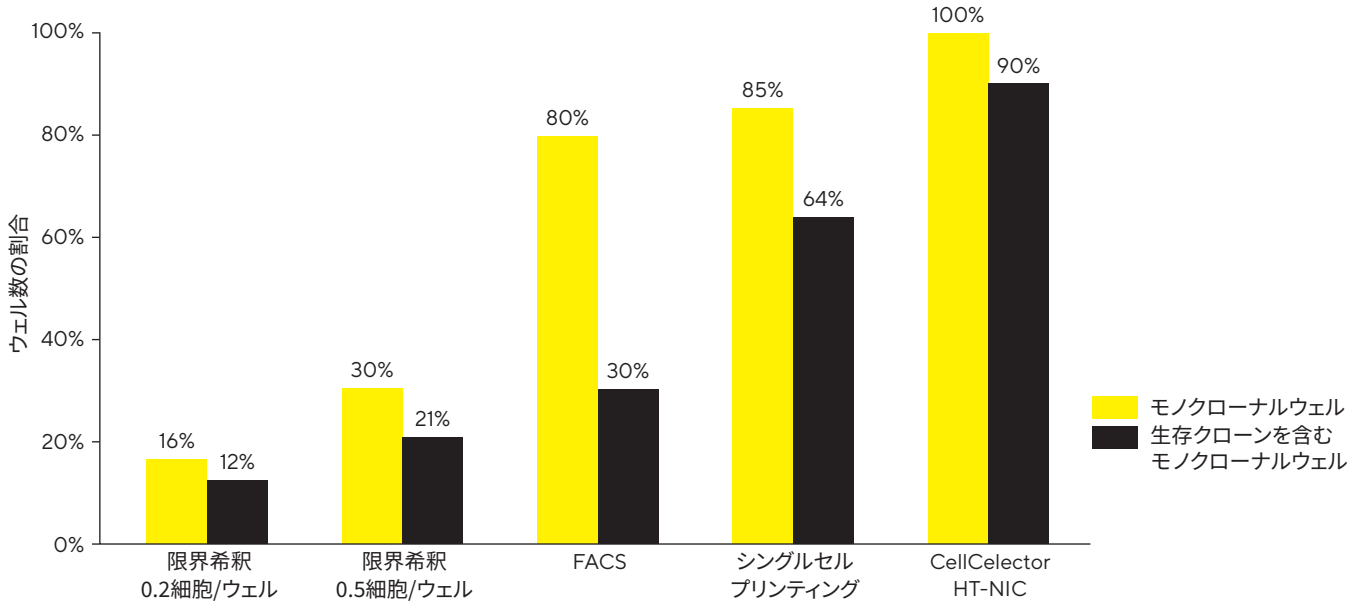
限界希釈法で400個のモノクローナルウェルを得るには、96ウェルプレートを26枚(0.2細胞/ウェルの播種密度)、または96ウェルプレートを13枚(0.5細胞/ウェルの播種密度)を使用する必要があります。HT-NIC法では、同じ数のモノクローナルウェルに到達するのにCellSelectorナノウェルプレートの1ウェルだけで十分です。



高い割合で生存シングルセルクローンが得られます

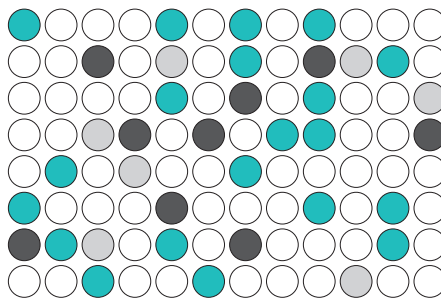
限界希釈法では、得られるシングルセルは播種されたウェルのわずか10%~20%にとどまります。FACSシングルセルソーティングやシングルセルプリンティングなどの他の従来の方法では、より多くのシングルセルが得られますが、通常、フローサイトメトリーに伴う高いせん断応力と、細胞が単一で大量の培地

中に存在するという事実は、30%~64%の割合で不確実な増殖を引き起こします。また、これらの方法は、外部からの成長因子を含む特殊で高価なクローニング培地を必要とし、簡単にシングルセルからは増殖しない、増殖困難な細胞株には適しません。

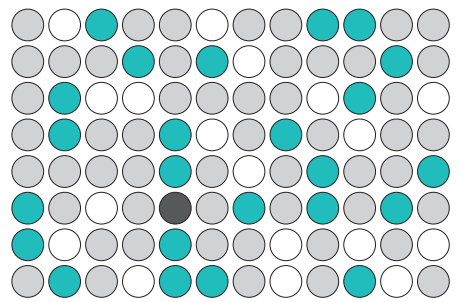


CellCelector HT-NIC法では、すべての播種細胞が同じ培地を共有し、クローン性を損なうことなく天然の成長因子を放出することで互いの成長に寄与しています。クローンのモノクローナリティおよび生存可能であることが証明された後にのみ、クローンが選択され、96ウェルプレートに穏やかに移されます。シングルセル一つではなく、生存可能でモノクローナルな小さなクローン細胞群が移されるため、大きなウェルの中で増殖し続けます。

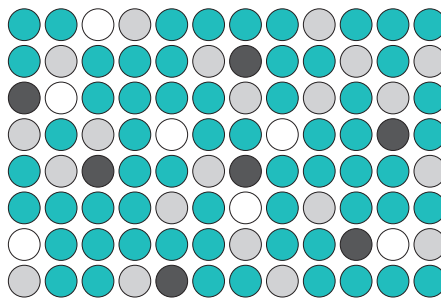
限界希釈 0.5細胞/ウェル-20.8%



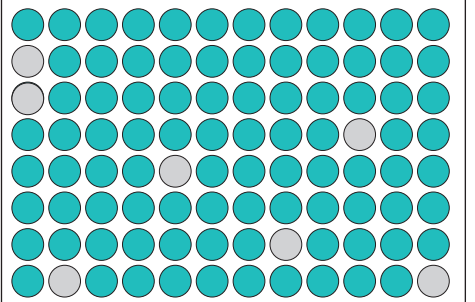
FACS-30%



シングルセルプリンティング-64%



CellCelector HT-NIC-95%



○ 空のウェル ● モノクローナル、非生存 ● モノクローナル、生存 ● 1ウェルに数個のクローン

ハイスループットなシングルセルクローニングにCellCelector Flexを使用するメリット

使いやすさ	<ul style="list-style-type: none">③複雑なサンプル前処理や高価な消耗品は不要③定期的なメンテナンスが不要
極めて高い汎用性	<ul style="list-style-type: none">③個々のシングルセル、クラスター、シングルセルクローン、スフェロイド、小オルガノイド、胚様体の正確な単離③初代細胞および細胞株、生細胞および固定された細胞
柔軟性	<ul style="list-style-type: none">③明視野、位相差、および蛍光イメージング③自動、半自動、または手動での細胞選択によるピッキング③あらゆる標準またはカスタムのソースおよびデスティネーション容器（ナノウェルアレイ、マイクロプレート、ディッシュ、スライド、フィルター、チップ、PCRプレート チューブ）に対応
信頼性	<ul style="list-style-type: none">③選択された特定のサブ集団の95%を超えるピッキング精度③移動するオブジェクトの自動再位置決め機能③ピッキング失敗時に再ピッキングが可能③ピッキングの成功をソフトウェアが自動的に検出③自動化されたピッキング品質管理(ピッキングされた細胞 失敗した細胞)
穏和な手法	<ul style="list-style-type: none">③細胞の特徴的な性質に影響を与えない③分子特性解析や細胞培養に適した高純度でインタクトな細胞の単離（低せん断応力：キャピラリー内で10秒以下）③ピッキング後の高い細胞の完全性と増殖率（シングルセルクローニングアプリケーションでの最大95%以上の生存率を含む）③自動化されたピッキング品質管理(ピッキングされた細胞 失敗した細胞)
ダウンストリームアプリケーションへの対応性	<ul style="list-style-type: none">③少ない吸引量、分注量、およびバッファー量（～1 nlまで）③シングルセルPCR、NGS、WGA、RNA-Seq、ゲノム編集、細胞クローニング、不均一性の研究など
ドキュメント化	<ul style="list-style-type: none">③GLPおよびGMP基準に準拠した完全なワークフローのドキュメント化③各ピッキングイベントの前後に撮影されたライブトラッキングと高画質リアルタイム画像を使用した品質管理③検出 ピッキングされた各オブジェクトに固有のIDが付与され、ソースからデスティネーションウェルまで追跡可能③全画像および数値データを簡単にエクスポート

ザルトリウス・ジャパン株式会社
東京本社
〒140-0001
東京都品川区北品川1-8-11
Daiwa 品川Northビル4階
Phone: 03 6478 5200
Fax: 03 6478 5494

名古屋営業所
〒461-0002
名古屋市東区代官町35-16
Phone: 03 6478 5204
Fax: 03 6478 5497

大阪営業所
〒532-0003
大阪市淀川区宮原4-3-39
Phone: 03 6478 5203
Fax: 03 6478 5496

 Email: hp.info@sartorius.com
For additional information,
visit www.sartorius.com